12-11

Premix Colony Direct PCR Kit

Insert Check -Ready-

(Code No. PIK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3273K

—目次—

[1]はじめに・・・

［1］はじめに

DNA断片をプラスミドにサブクローニングしたときに欠かせないのが、得られたクローンに目的の断片が入っていることの確認です。従来は、コロニーからスモールスケールの液体培養を行い、ミニプレップによりプラスミドを精製し、制限酵素で切断してインサートサイズを確認するという煩雑な操作が必要でした。最近は、これに代わってコロニーから直接PCR（Colony Direct PCR）を行い、インサートを確認する方法が用いられるようになっています。しかしながら、この方法でもDNA Polymerase、Buffer、dNTPsなどを使用前に混合する必要がありました。

Insert Check -Ready- は、Colony Direct PCRに必要なすべての試薬を含んだプレミックスPCRキットで、試薬をPCR用チューブに分注し、コロニーを加えるだけでPCRを行えます。また、λZAP® Ⅱ [*1]で作製したライブラリーのインサートサイズの確認にもご使用いただけます。

Insert Check -Ready-には、以下の特徴があります。

- Primer、dNTPs、DNA PolymeraseなどPCRに必要な試薬が1x濃度でミックスされており、すぐにPCRを行えます。
- Primerにシーケンシング用のM13 Primerを用いているため、pBluescript®[*1]、pUC、pGEM®[*2]などのプラスミドで使用できます。また、λZAP® Ⅱ [*1]でも使用できます。
- DNA PolymeraseはDNA合成速度および増幅効率に優れたKOD Dashを用いているため、Taqに比べて短時間でPCRが完了します。
- このキットを用いることにより、目的とするクローンの確認やDeletion Mutantのサイズの確認が容易に行えます。また、得られたPCR産物は弊社DNAフラグメント精製キットMagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-（Code No. NPK-601）などを用いて精製することにより、シーケンシング用の鋳型としても利用できます。
- 安定性に優れたKOD Dashを用いているため、凍結融解を50回まで繰り返しても活性の低下は認められません。

[*1] pBluescript®およびλZAP®はAgilent社の登録商標です。

[*2] pGEM®はPromega社の登録商標です。

［2］キットの内容

Insert Check -Ready- Solution（1ml×5本）

＜Insert Check -Ready- Solutionに含まれているもの＞

- 0.05U/μl　KOD Dash
- 0.2mM　　dNTPs
- 0.2μM M13 Primer P7（5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'）
- 0.2μM M13 Primer P8（5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGAAAC-3'）
- 1x Reaction Buffer（1.4mM $MgCl_2$含有）

［3］保存

本品は－20℃で保存してください。また、激しい攪拌操作はできるだけ避けてください。

［4］ご用意いただくもの

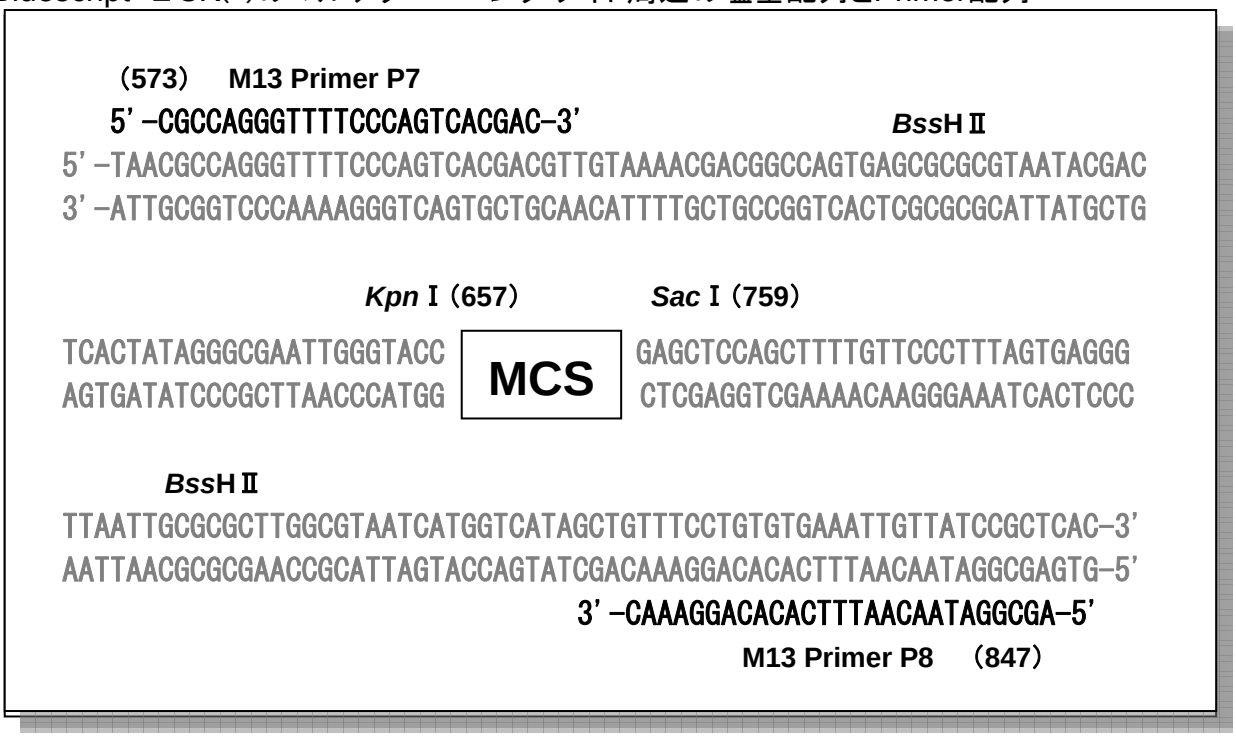
1. 機器・器具
   - サーマルサイクラー
   - アガロースゲル電気泳動装置
   - UVトランスイルミネーターおよび撮影装置
   - レプリカ用プレート
   - レプリカ用爪楊枝またはチップ
   - PCR用チューブ

2. 試薬
   - ミネラルオイル
   - アガロースゲル
   - DNAサイズマーカー
   - SM Buffer（ファージ懸濁用）
   - クロロホルム（ファージ懸濁用）

［5］主なベクターとインサートがない場合のPCR産物のサイズ

ベクター	pUC19	pBluescript® Ⅱ	pGEM-11zf(−)	pCR2.1
サイズ（bp）	149	275	230	245

pBluescript® Ⅱ SK(−)のマルチクローニングサイト周辺の塩基配列とPrimer配列



［6］プロトコール

操作上の留意点

- Insert Check -Ready- Solutionは時々攪拌しながら室温または手中で融解させてください。高温で融解するとプライマーダイマー発生の原因になります。また、激しい攪拌操作はできるだけ避けてください。
- 融解後は瞬時遠心し、氷上に置いてください。

1. 大腸菌プラスミドのインサートチェック

【準備】

- トランスフォーメーションしてコロニーのできたプレート
- レプリカ用の新しい抗生物質入りプレート
- 滅菌済み爪楊枝またはチップ

(1) 融解したInsert Check -Ready- SolutionをPCR用チューブに50µlずつ分注する。[*1]

(2) 爪楊枝またはチップでコロニーを軽く突く。[*2]

(3) レプリカ用のプレートに爪楊枝（またはチップ）の先端を突き刺す。[*3]

(4) 爪楊枝（またはチップ）の先端を(1)のPCR用チューブに入れ、すすぐ。[*4]

(5) 必要に応じてミネラルオイルを加えて蓋をする。

(6) チューブをサーマルサイクラーにセットしてPCRを行う。

＜PCR条件＞

94℃、 4min
↓
94℃、30sec[*5]
60℃、 5sec
72℃、 Xsec[*6]
30cycles

(7) PCR終了後、各反応液の一部を電気泳動でチェックする。

(8) 電気泳動の結果からポジティブクローンの判定を行い、レプリカしたプレートの当該クローンを必要に応じて液体培養し、プラスミドを抽出する。

[*1] 液量は50µlが標準ですが、25～100µlの範囲で十分な増幅量が得られます。

[*2] 菌体成分などによるPCR阻害を回避するため、できるだけ直径1mm前後のコロニーを選択してください。

[*3] レプリカしたプレートは逆さにして37℃で培養してください。6～8時間程度でコロニーが確認できる程度の生育がみられます。

[*4] 溶液に爪楊枝を長時間浸すと溶液を吸収します。サンプル数が多い場合には爪楊枝の代わりにチップを使用し、チューブに立てて目印とすることで、サンプルを混同する可能性を低減できます。

[*5] オイルフリータイプのサーマルサイクラーの場合は20secにしてください。

[*6] ターゲット長が2kb以下の場合は30sec、それ以上の場合は1min/2.5kbを目安としてください。

2. ファージのインサートチェック

【準備】

- トランスフェクションしてプラークのできたプレート
- SM Buffer[*1]およびクロロホルム

(1) プレート上のプラークを先を切ったチップで取り、200μlのSM Bufferに懸濁する。クロロホルムを20μl加えて20sec程度ボルテックスした後、室温で2時間放置する。

(2) 融解したInsert Check -Ready- SolutionをPCR用チューブに50μlずつ分注する。*2

(3) (1)のファージ液1μlを(2)のPCRチューブに加える。

(4) 必要に応じてミネラルオイルを加えて蓋をする。

(5) チューブをサーマルサイクラーにセットしてPCRを行う。

＜PCR条件＞

94℃、 4min

↓

94℃、30sec*3 ┐

30cycles

68℃、 Xsec*4 ┘

(6) PCR終了後、各反応液の一部を電気泳動でチェックする。

---

*1 SM Buffer（1リットルあたり）

NaCl	5.8g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0g
1M Tris-HCl（pH 7.5）	50ml
2% Gelatin Solution	5ml

*2 SM Bufferに含まれるMg^{2+}の影響を受けますので、Insert Check -Ready- Solution 50μlに対してファージ液1μlでPCRを行ってください。

*3 オイルフリータイプのサーマルサイクラーの場合は20secにしてください。

*4 ターゲット長が2kb以下の場合は30sec、それ以上の場合は1min/2.5kbを目安としてください。

［7］PCR産物の処理

1. 制限酵素処理

- 本キットには15mMのK^+が存在します。使用する弊社制限酵素の反応BufferがH BufferまたはM Bufferの場合、反応ボリュームの20%を目安にPCR産物を加えて処理してください。L Bufferの場合は、弊社MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-（Code No. NPK-601）を使用してPCR産物を精製することをおすすめします。 詳しい使用法はキットに付属の取扱い説明書をご参照ください。

2. シーケンシング

- 弊社MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-（Code No. NPK-601）を使用してPCR産物を精製してください。詳しい使用法はキットに付属の取扱い説明書をご参照ください。

［8］トラブルシューティング

1. バンドがみられない

⑴培養時間が長くコロニーが大きすぎる場合、プラスミドが欠落していることがあります。コロニーの大きさは直径1mm程度を目安にしてください。

⑵ GC含量の高い遺伝子をターゲットとする場合は、変性を98℃、20secとしてPCRを行ってみてください。

⑶ PCRに用いる菌やファージの数が少ない可能性があります。コロニーの場合はレプリカの前に爪楊枝（チップ）をPCR溶液に浸してください。また、プラークの場合はタイターを確認してください。6kb以上のターゲットでは5×10^5以上のタイターが必用な場合があります。

2. 非特異的増幅産物が多い

⑴ PCRの反応時間が長すぎる可能性があります。伸長時間を30%程度短くして反応を行ってください。

⑵ PCRに用いる菌やファージの数が多すぎることが考えられます。レプリカを行わない場合は、サイクル数を25回としてPCRを行ってください。

［9］参考文献

1）Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T.（1997）*Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4504-4510

2）Barns, W. M.（1994）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2216-2220

【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（東京)
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目10番2号　東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ http://www.toyobo.co.jp/bio